

Incidencia de la bacteria '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' en el cultivo y las propiedades fisicoquímicas y organolépticas de la zanahoria

'*Candidatus Liberibacter solanacearum*' (CaLsol) es una bacteria asociada a desórdenes vegetativos en cultivos estratégicos a escala mundial, como patata, tomate y pimiento en el continente americano y Oceanía, y zanahoria, apio y chirivía en Europa. La bacteria está restringida al floema de la planta hospedadora y la hemolinfa de psílidos que se alimentan de floema y constituyen la principal vía de transmisión, y que, según su especie, tienen preferencia por los cultivos de solanáceas o apiáceas. Los desórdenes descritos son perceptibles de manera visual y pueden llegar a limitar en las condiciones ambientales de la cuenca mediterránea, la comercialización de tubérculos, raíces y frutos de las plantas infectadas, causando un impacto económico importante. El objetivo de este estudio fue el análisis de la incidencia de infección por CaLsol en cultivos de zanahoria en condiciones de la cuenca mediterránea, así como su correlación con la calidad del producto que llega al consumidor. A lo largo de dos campañas consecutivas en Villena (Alicante), se encontraron niveles crecientes de infección por CaLsol, superiores al 70% al final del período de cultivo; sin embargo, no se pudo establecer correlación con posible sintomatología y, además, las características fisicoquímicas y organolépticas de las zanahorias no se vieron afectadas por la presencia de la bacteria.

PALABRAS CLAVE: CaLsol, apiáceas, solanáceas, calidad, comercialización, psílidos, floema.

M. Herrero-Cervera¹, S. Barbé¹, I. Navarro¹, P. Tarancón², C. Besada², E. Marco-Noales¹

Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Moncada (Valencia).

¹ Centro de Protección Vegetal y Biotecnología. Unidad de Bacteriología.

² Centro de Tecnología Postcosecha. Grupo de Evaluación Sensorial.

INTRODUCCIÓN

'*Candidatus Liberibacter solanacearum*' (CaLsol) es una bacteria restringida al floema de sus hospedadores vegetales y a la hemolinfa de sus insectos vectores (EPPO, 2020) y que, hasta la actualidad, no se ha podido cultivar en condiciones de laboratorio, lo cual dificulta su estudio y, en consecuencia, su clasificación taxonómica (de ahí la palabra *Candidatus* delante del nombre propuesto). Las plantas a las que afecta pertenecen a las familias *Apiaceae* (apio, chirivía, zanahoria) y *Solanaceae* (patata, tomate, pimiento), cultivos básicos en la alimentación a escala mundial. La

bacteria se transmite principalmente por psílidos vectores de diferentes especies que, al alimentarse de la savia elaborada de plantas infectadas, pueden adquirir la bacteria e infectar posteriormente otras plantas a lo largo de toda su vida (Bertolini *et al.*, 2015; Haapalainen *et al.*, 2018; Teresani *et al.*, 2014).

Actualmente, CaLsol se clasifica en ocho haplotipos (A-F, H y U), que son grupos genéticamente diferenciados por variaciones en nucleótidos aislados (polimorfismos de nucleótidos únicos, "SNPs") en regiones conservadas de su genoma (Haapalainen *et al.*, 2020). Los haplotipos descritos

en América y Oceanía afectan a cultivos de solanáceas y sus psílidos transmisores no se han descrito hasta la fecha en Europa (Mendoza-Herrera *et al.*, 2018; Vereijssen *et al.*, 2018). En nuestro continente, los haplotipos descritos afectan principalmente a apiáceas (Teresani *et al.*, 2014).

La primera enfermedad descrita asociada a CaLsol, y la que mayor impacto tiene, es la enfermedad del Zebra chip en patata (Secor *et al.*, 2009). Su síntoma más característico es la aparición de tonalidades pardas y moteados necróticos en los radios medulares de los tubérculos, que dan nombre a la enfermedad cuando se fríen láminas de la patata

afectada (**Figura 1G**) (Mendoza-Herrera *et al.*, 2018). En zanahoria, chirivía y apio, las hojas adquieren coloraciones amarillas o púrpuras (**Figura 1A**); en algunas plantas se produce una gran proliferación de hojas y los tallos se hacen filiformes y se enrollan entre sí (**Figura 1B y C**), síntoma que se acentúa en apios (**Figura 1E y F**). Las raíces tienen su eje vertical torcido y la parte del floema presenta engrosamientos que las hace más fibrosas. Es común la presencia de raicillas secundarias y, en chirivía, se observa, en ocasiones, un oscurecimiento de los haces vasculares de las raíces (**Figura 1D**) (Bertolini *et al.*, 2015; Teresani *et al.*, 2014). Algunos de estos síntomas pueden aparecer también en perejil, perejil de raíz, hinojo o perifollo infectados por CaLsol (M. Haapalainen *et al.*, 2020; Hajri *et al.*, 2017). Hasta el momento no se ha podido correlacionar la presencia de CaLsol con toda la sintomatología descrita, debido a la imposibilidad de reproducir los postulados de Koch al no haberse podido cultivar *in vitro* la bacteria (Teresani *et al.*, 2014).

En España, CaLsol se detectó por primera vez en 2009, en plantaciones de zanahoria al aire libre en Alicante (Alfaro-Fernández *et al.*, 2012), y posteriormente en apio en la misma

zona (Teresani *et al.*, 2014), siendo *Bactericera trigonica* su principal vector, aunque no el único (Antolínez *et al.*, 2019; Teresani *et al.*, 2017). En el norte y centro de Europa, el principal vector de CaLsol es *Trioza apicalis*, que constituye por sí mismo una plaga de gran importancia económica en explotaciones hortícolas, como las de zanahorias, pudiendo llevar a la pérdida total del cultivo (Markkula *et al.*, 1976; Munyaneza *et al.*, 2010; Nehlin *et al.*, 1994). Incluso se ha comprobado que la abundancia de estos insectos reduce significativamente el rendimiento de la planta (Nissinen *et al.*, 2007) e, indirectamente, la calidad de la zanahoria, al producirse una disminución en la concentración de los azúcares presentes en las raíces, y una mayor concentración de algunos compuestos fenólicos (Nissinen *et al.*, 2012; Seljåsen *et al.*, 2013), lo que hace que las zanahorias se tornen más duras, menos crujientes, amargas y astringentes (Seljåsen *et al.*, 2013).

Además de la importancia, desde un punto de vista fitosanitario, de conocer la incidencia de CaLsol en las hortalizas cultivadas, es de mucho interés plantearse el posible efecto de su presencia en la calidad final del producto. Diferentes

estudios han mostrado que la infección por otra bacteria género 'Ca. Liberibacter', 'Ca. L. asiaticus', causante del HLB en los cítricos, afecta negativamente al fruto, a su apariencia, maduración y a la calidad organoléptica del zumo (Plotto *et al.*, 2010; Raithore *et al.*, 2015). Por tanto, CaLsol podría afectar negativamente a las propiedades sensoriales de las hortalizas, disminuyendo, en consecuencia, su valor de mercado (Nehlin *et al.*, 1994). Actualmente sabemos que en el Zebra chip se producen una serie de alteraciones que modifican la calidad de las patatas, repercutiendo negativamente en su apariencia y sabor, especialmente cuando se fríen (Crosslin *et al.*, 2010), pero hasta la fecha no se ha hecho una evaluación del posible efecto de CaLsol sobre las propiedades organolépticas de las zanahorias, y disponer de esta información es clave, ya que un efecto negativo podría comprometer los estándares de calidad actuales.

En este contexto, el objetivo de este estudio fue el análisis de la incidencia de infección por CaLsol en cultivos de zanahoria, y la evaluación del posible efecto de la bacteria sobre la calidad físicoquímica de las zanahorias, determinando también hasta

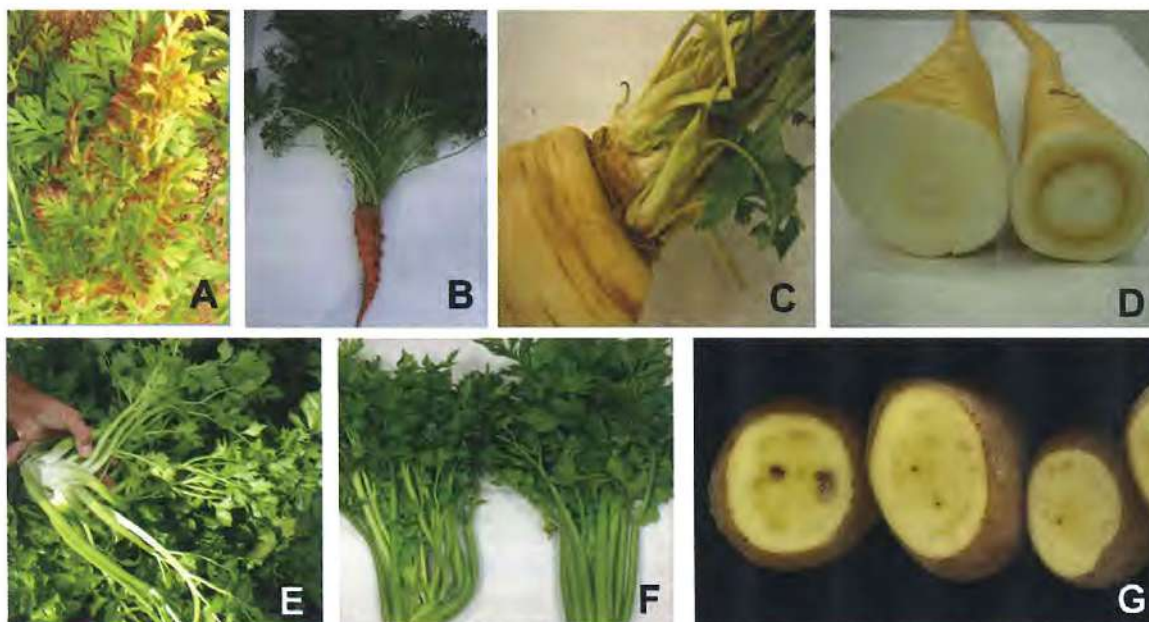


Figura 1. Síntomas asociados con CaLsol en diferentes plantas hospedadoras. A) Detalle de la coloración amarilla y púrpura que presentan las hojas de zanahorias infectadas. B) Zanahorias con gran proliferación de hojas y tallos filiformes enrollados entre sí. C) Proliferación de tallos en chirivía. D) Oscurecimiento de los haces vasculares en raíces de chirivía. E y F) Proliferación anormal de tallos en apio. G) Radios medulares con tonalidades pardas y moteados necróticos en patata. (Fotos A, B y G, IVIA; fotos C, D, E y F: Cooperativa Agrícola Villena).

qué punto la infección afecta a las propiedades organolépticas percibidas por el consumidor.

Proyecto europeo POnTE (2015-2019)

En el ámbito del proyecto de investigación europeo POnTE (*Pest Organisms Threatening Europe*) del Horizonte 2020, en el que ha participado activamente el IVIA a través de diferentes grupos de investigación, uno de los objetivos era minimizar el impacto de patógenos emergentes en la Unión Europea, como CaLsol. El proyecto estaba formado por un consorcio de 25 entidades internacionales, entre las que se encuentran equipos de investigación, universidades, casas productoras de semillas, compañías agroquímicas, cooperativas agrícolas y empresas para la detección y el manejo de organismos patógenos y sus vectores.

El equipo de Bacteriología del IVIA estuvo involucrado en aspectos de la investigación sobre CaLsol relacionados con su genotipo, biología, patogénesis, métodos de diagnóstico y desarrollo de estrategias de mitigación de las enfermedades asociadas. Para todo ello se dispuso de varias parcelas experimentales de cultivo de zanahoria en Alicante, gracias a la colaboración de la cooperativa Agrícola Villena. Los resultados que aquí se muestran se derivan, en gran parte, del trabajo realizado a lo largo del tiempo de duración del proyecto en esas parcelas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Parcelas de cultivo

Se hizo un seguimiento de la posible infección por CaLsol en cultivos de zanahoria durante dos campañas consecutivas. Para ello, en mayo de 2018 y en mayo de 2019 se plantaron semillas de zanahoria de la variedad Soprano F1, previamente analizadas para descartar la contaminación con CaLsol, en parcelas al aire libre, dos en 2018 y dos en 2019, en ubicaciones próximas dentro

del término municipal de Villena (Alicante). El abono, el riego y los cuidados generales fueron los propios de las parcelas comerciales. En diferentes puntos de las mismas se instalaron trampas amarillas y dispositivos electrónicos de captura de imágenes para monitorizar la presencia y abundancia de psílidos vectores.

Determinación del grado de infección de las zanahorias por CaLsol

En ambas campañas, 2018 y 2019, aproximadamente a los 2, 4 y 6 meses desde la siembra, y al tiempo de la cosecha, se hizo una inspección visual de posible sintomatología asociada a CaLsol. Además de recoger el material vegetal con síntomas para analizar la presencia de la bacteria, se tomaron, de manera aleatoria, muestras de hoja de zanahoria ($n = 30$), y se conservaron refrigeradas hasta su análisis en laboratorio. También se cogieron otras muestras para estudiar la distribución de CaLsol a lo largo de la planta, analizando submuestras representativas de varias zonas de hojas, tallos y raíces. En todos los casos se empleó el método de CTAB para extraer el ADN, y después este se analizó mediante PCR en tiempo real siguiendo los protocolos recomendados por EPPO (2020) para la detección específica de CaLsol, Li *et al.* (2009) y Teresani *et al.* (2014). Los valores de la PCR en tiempo real se miden en lo que se llaman Ct (*Cycle threshold*), un valor umbral por encima del cual se detecta la bacteria, de manera que, a menor Ct, mayor es la cantidad de bacteria detectada. Este valor oscila normalmente entre 20 y 37, aunque tiene un rango teórico entre 0 y 45 en ambos protocolos. Se hizo también cuantificación bacteriana, según la modificación de la aproximación de Bertolini *et al.* (2015), para establecer una correspondencia entre los valores obtenidos con la PCR y el número de células de CaLsol por mL de extracto vegetal analizado.

Calidad fisicoquímica de las zanahorias

En la segunda campaña (2019), un lote de 35 zanahorias en las que no se detectó CaLsol, "sanas" (Lote S), y un lote de 35 zanahorias en las que sí se detectó, "infectadas" (Lote I), fueron analizados en el laboratorio del Centro de Tecnología Poscosecha del IVIA para la evaluación de su calidad fisicoquímica y sensorial. Primero, se determinó el peso de cada una de las muestras; luego, se seleccionaron 15 zanahorias para la evaluación de los parámetros fisicoquímicos (diez de ellas con un peso inferior a 80 g y cinco de alrededor de 40 g), mientras que las 20 zanahorias restantes se destinaron al estudio sensorial.

Para valorar la calidad fisicoquímica de las zanahorias se evaluaron los siguientes parámetros: color, firmeza, relación xilema-floema, pH y sólidos solubles totales (SST). El color se midió con un colorímetro portátil, y se realizaron 4 medidas alrededor de la superficie exterior de cada zanahoria, recogiendo los parámetros de Hunter (L , a , b). La relación entre el xilema y el floema se determinó mediante medición de los diámetros (interno, d_i , y externo, d_e) con un pie de rey sobre dos cortes transversales realizados a media altura (área equidistante entre la zona apical y las hojas), y fue expresada como $\text{xilema/floema} = d_i / d_e - d_i$ (Richmond *et al.*, 2011). Sobre los mismos cortes se determinó la firmeza de ambos tejidos mediante un texturómetro, usando una sonda de base plana de 8 mm y expresando los resultados como la fuerza en Newtons (N) necesaria para romper el tejido. Para evaluar el pH y el contenido de SST se obtuvieron zumos a partir de cinco zanahorias de cada lote mediante licuado y posterior tamizado a través de filtro de gasa. El pH se determinó con un pH-metro y el contenido de SST con un refractómetro digital, cuyos resultados fueron expresados como °Brix.



Figura 2. Ejemplo de dos de los tríos que fueron presentados a los consumidores en ensayos triangulares para evaluar calidad visual de las zanahorias. Los códigos 321 y 647 se corresponden con muestras "sanas" (en las que no se había detectado CalSol), y los códigos 938 y 275 con muestras "infectadas" (en las que sí se había detectado CalSol).

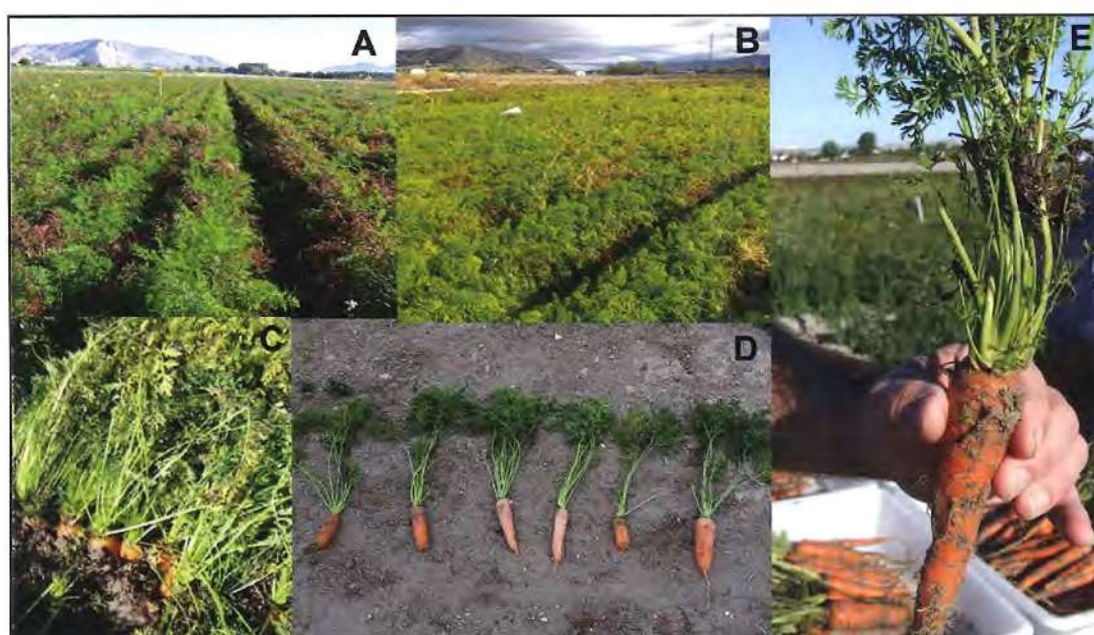


Figura 3. Sintomatología observada en campos de cultivo de zanahoria en Villena infectados con CalSol. En los campos experimentales del ensayo se observaron, al tiempo de la cosecha: plantas con tonalidades moradas (A y E) o amarillentas (B), tallos filiformes (C y E), raíces engrosadas y curvadas (D), y proliferación de raicillas secundarias (E), síntomas todos ellos asociados con frecuencia a CalSol.

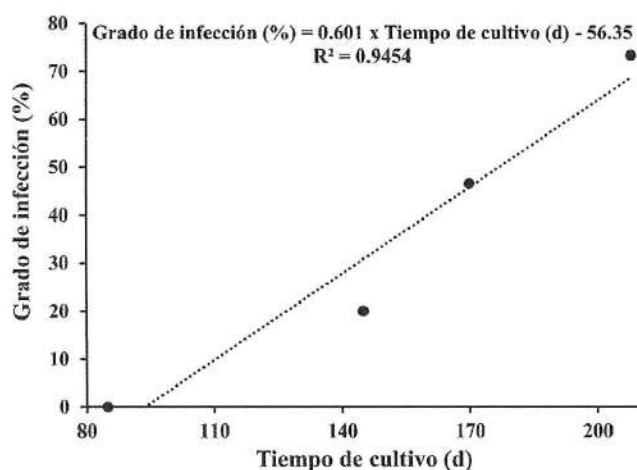


Figura 4. Grado de infección (%) por CalSol de zanahorias de una parcela de cultivo en Villena. El grado de infección se calculó como el número de muestras positivas para CalSol respecto al número total ($n = 30$) recogido en cada tiempo de muestreo. La línea discontinua corresponde a la correlación lineal.

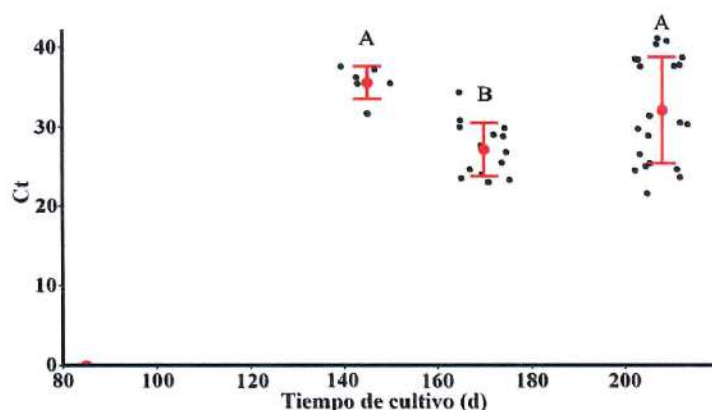


Figura 5. Valores de Ct de PCR en tiempo real (Li et al., 2009) para la detección de CalSol en una parcela de cultivo de zanahorias en Villena. Los valores individuales se representan con puntos negros, mientras que la media muestral y la desviación estándar se representan en color rojo. Las letras iguales definen variables sin diferencias significativas, mientras que las letras diferentes indican variables con diferencias significativas.

Evaluación sensorial

Se llevaron a cabo pruebas discriminativas en las que se evaluó el posible efecto de la infección sobre la apariencia de las zanahorias y las propiedades percibidas por el consumidor cuando las degusta. En ambos casos, la prueba seleccionada fue el test triangular, en el que se presentaron a los participantes (consumidores) tres muestras de zanahoria simultáneamente (dos del lote S y una del I, o viceversa), y se les pidió que indicaran cuál de las muestras era diferente. Las muestras se presentaron de manera codificada, y en un orden balanceado, para evitar cualquier efecto debido a la posición y se tuvo la precaución de utilizar zanahorias de similar tamaño para la formación de los diferentes tríos. Así, para la evaluación del aspecto de las zanahorias, a cada participante se le mostraron tres fotografías, incluyendo cada una de ellas una zanahoria entera y una partida longitudinalmente. En total se generaron seis tríos de fotografías para balancear la presentación de las muestras. En la **Figura 2** se muestran dos ejemplos de estos tríos. En el caso del test en boca, cada consumidor recibió tres muestras formadas cada una de ellas por tres rodajas transversales de 0,5 cm de grosor y se le pidió que probara al menos dos rodajas de cada muestra.

Análisis estadístico

En los ensayos de infección de zanahorias por CaLSol, los datos se analizaron mediante pruebas estadísticas de comparación de dos muestras o de más de dos muestras. Las diferencias entre muestras fueron significativas cuando el valor p (ajustado) de la prueba estadística fue menor que el error tipo I (α ; en este caso, para un nivel de confianza de 95%, $\alpha = 0,05$). Para esto se utilizó el paquete de R "stats" (versión 3.6.3). En el caso de los parámetros fisicoquímicos estudiados, para determinar si la infección de la bacteria tenía un efecto sobre el valor medio de los diferentes parámetros se utilizó la prueba test t de Student,

con un nivel de confianza del 95%. Se usó para ello el programa Statgraphics Plus 5.1. Para el análisis de los resultados de los test triangulares se calculó (en función del total de aciertos) la significación de las diferencias en base a una distribución binomial ($P = 0,05$) usando el programa XL-stat (versión 2019).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Observación de síntomas en los cultivos de zanahoria

Tanto en la campaña de 2018 como en la de 2019, y solo al final del período de cultivo (tiempo de la cosecha), algunas zanahorias presentaban cierta sintomatología que se suele asociar a la infección por CaLSol (**Figura 3**). Así, aproximadamente un 20% presentaban, en grado variable, decoloración de las hojas hacia tonos amarillentos o morados, mientras que alrededor del 5-10% presentaban tallos filiformes y raíces engrosadas, así como alguna curvatura de los tallos.

El tiempo de cultivo se correlaciona positivamente con la infección por CaLSol en zanahoria

En ambas campañas se observó una correlación lineal entre los tiempos de muestreo y el grado de infección de la zanahoria por CaLSol según la detección mediante PCR en tiempo real, es decir, a medida que avanzaba el período de cultivo se detectaba la bacteria en un mayor número de plantas. Así, se observa que, por ejemplo, en la campaña de 2019, de un grado de infección del 0% a los 85 días desde la siembra se pasa a un 73,33 % a los 208 días (**Figura 4**), lo que significa una media de 1,25 plantas infectadas más por semana. Este incremento está probablemente relacionado con el tiempo acumulado de exposición a los vectores a lo largo del período de cultivo.

El elevado grado de infección de las plantaciones en comparación con la baja sintomatología observada cuestiona la incidencia real de CaLSol. Algunas líneas

de investigación apuntan a la posibilidad de una co-infección de CaLSol con otros organismos tipo virus, fitoplasma u otras especies bacterianas que, en conjunción con determinadas condiciones ambientales, podrían llegar a causar una sintomatología severa que pueda incluso traducirse en reducción de la calidad del producto.

Por otro lado, los valores de C_t de la PCR fueron $35,56 \pm 2,11$, $27,16 \pm 3,36$ y $32,57 \pm 6,87$ para cada uno de los tiempos de muestreo en los que se detectó la bacteria (**Figura 5**). Es decir, se observaron más plantas infectadas (grado de infección) a tiempo final pero no una mayor abundancia de la bacteria (valores de C_t) en cada una de ellas. Esto sugiere una inoculación de la bacteria en las plantas de forma continuada, dependiente de la abundancia y eficacia de los vectores, y posiblemente una distribución no homogénea de la bacteria en la planta, al menos en los primeros momentos de la infección. De hecho, los valores de C_t fueron significativamente distintos entre tiempos de muestreo (p -valor de la prueba de Kruskal-Wallis = 0,0077), tanto entre los 145 y 170 días como entre los 170 y los 208 días de cultivo (p -valores ajustados = 0,0226 y 0,0279, respectivamente).

CaLSol se distribuye uniformemente por toda la planta de zanahoria al final de cultivo

En las dos campañas (2018 y 2019), en el tiempo de recolección se observó que CaLSol se distribuía uniformemente por toda la planta, ya que no se encontraron diferencias significativas en la concentración de la bacteria entre las diferentes partes analizadas (**Figura 6**). La bacteria, una vez ha sido inoculada por el insecto, puede multiplicarse en el floema del hospedador y moverse arriba y abajo, llegando a distribuirse por toda la planta a partir de los 35 días de la infección (Munyanza *et al.*, 2010). En el ensayo de 2019, al igual que en el de 2018, se observó una mayor concentración media de

la bacteria en la zona del tallo (E) respecto a la zona de la raíz (B) y la de las hojas nuevas (G): $2,84 \times 10^4$ frente $5,14 \times 10^2$ y $3,46 \times 10^3$ células por mL de extracto, respectivamente, lo que puede indicar una infección algo tardía, probablemente por determinadas condiciones climáticas que afectan al ciclo de vida de los psílicos transmisores.

El porcentaje de muestras positivas en la interfase raíz-tallo (partes C y D de la **Figura 6**), respecto del total de muestras positivas, fue significativamente mayor en la campaña de 2018, 31,11 %, que en la de 2019, 23,64 % (p -valor de la prueba U de Mann-Whitney = 0,0279) (**Figura 7**). Sin embargo, si se comparan los datos en cada

campana, de forma individual, no se ven diferencias significativas en ninguna de ellas, probablemente por la gran variabilidad de los datos de infección con CaLsol, que es algo ya observado por otros autores en cultivos de zanahoria en el norte de Europa con este tipo de ensayos (Munyanza *et al.*, 2014). No obstante, numéricamente se observa que, tanto en 2018 como en 2019, la mayor parte de las muestras positivas pertenecen a la zona de las hojas de la zanahoria (partes E, F y G): 37,38 % y 43,64 %, respectivamente, lo cual tiene sentido dado que es la zona de la planta continuamente expuesta a los vectores y, por tanto, a la infección.

La infección por CaLsol no afecta a la calidad fisicoquímica y sensorial de las zanahorias

El primer factor de calidad de frutas y hortalizas que es evaluado por el consumidor es su apariencia externa, y estudios recientes han mostrado la importancia del color en las expectativas de calidad e intención de compra de ciertas frutas y hortalizas por parte de los consumidores (Schifferstein *et al.*, 2019; Morales *et al.*, 2020). De acuerdo a nuestros resultados fisicoquímicos no existieron diferencias significativas de color entre las zanahorias sanas e infectadas (**Figura 8A, B y C**), mostrando ambos lotes de zanahorias un valor 'L' ligeramente superior a 50, y valores de 'a' y 'b' cercanos a 30.

Las zanahorias evaluadas mostraron una relación xilema/floema de 0,6, y no se observó efecto de la presencia de la bacteria en este ratio (**Figura 8D**). En las zanahorias, el floema presenta una textura menos fibrosa que el xilema, y es la zona donde se acumula la mayor cantidad de azúcares, por lo que contribuye de forma importante a su carácter crujiente y al sabor dulce. Por este motivo, es deseable que la relación xilema/floema sea lo más baja posible (López Camelo, 2011). La relación xilema/floema presentada por las zanahorias evaluadas, tanto

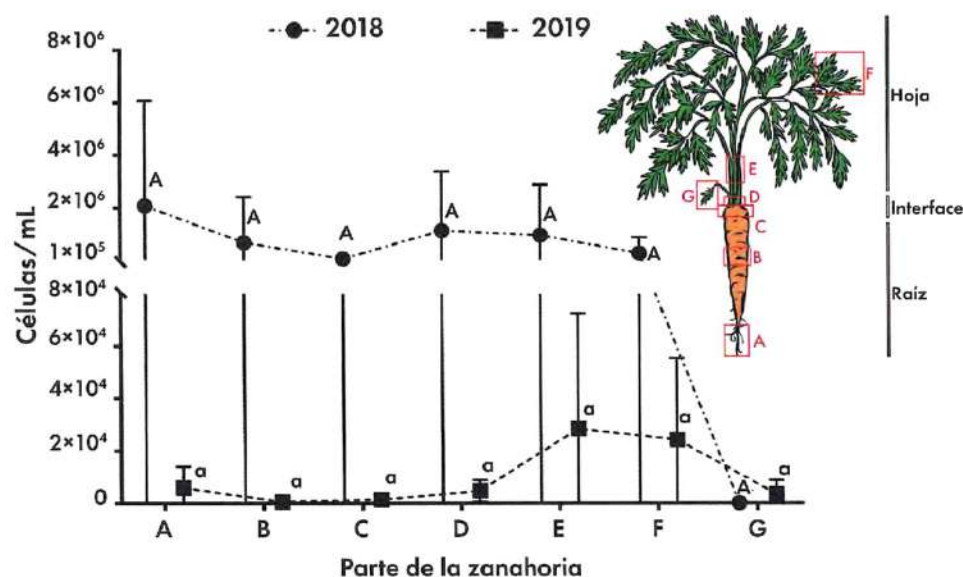


Figura 6. Distribución cuantitativa de CaLsol a lo largo de la planta de la zanahoria en parcelas de cultivo en Villena en los años 2018 (●) y 2019 (■). La cuantificación de CaLsol se realizó mediante PCR en tiempo real (Li *et al.*, 2009; Bertolini *et al.*, 2014) en diferentes partes de las zanahorias (A-G), esquematizadas en el dibujo (modificado de <https://storage.neepix.com>), en el momento de la cosecha. Los valores de células por mL de extracto vegetal representan medias ± desviaciones estándares de las muestras (n = 10). Las letras iguales definen variables sin diferencias significativas.

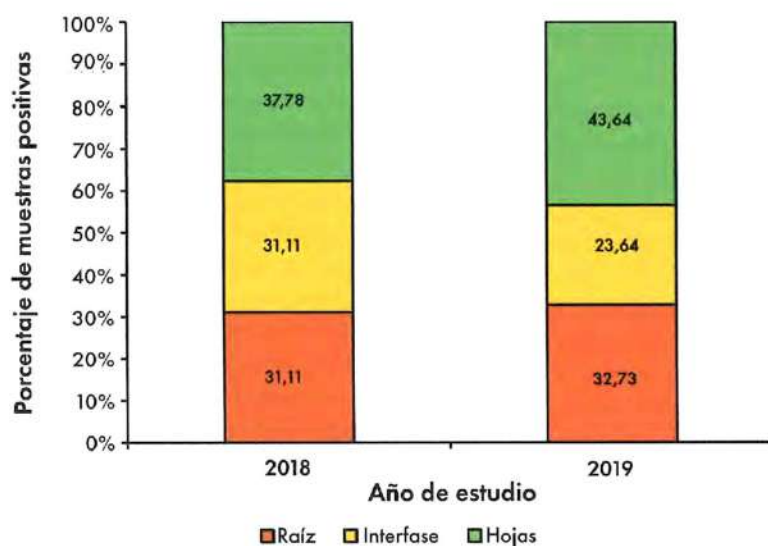


Figura 7. Porcentaje relativo de muestras de zanahoria positivas para CaLsol según la parte de la zanahoria en la que se detectó la bacteria. Este análisis se realizó en parcelas de zanahoria en Villena en los años 2018 y 2019, considerando como 100% el total de muestras positivas para CaLsol, independientemente de la parte de la zanahoria en la que se hubiese detectado la bacteria. Las letras iguales definen variables sin diferencias significativas, mientras que las letras diferentes indican variables con diferencias significativas.

sanas como infectadas, es acorde a la descrita por otros autores (Richmond *et al.*, 2011).

En lo que respecta a los valores de firmeza, como cabía esperar, estos fueron más elevados en el xilema que en el floema, con valores entorno a 125N y 110N, respectivamente. Al igual que en el resto de los parámetros, no se observó un efecto de la infección sobre la firmeza de

las zanahorias (Figura 8E y F). En concordancia con esto, tampoco el contenido de SST o el pH se vieron afectados, mostrando tanto la zanahoria sana como la infectada valores de SST cercanos a 9,5 y un pH en torno a 6,1 (Figura 8G y H). De hecho, los valores de color (L, a, b), la relación xilema/floema, SST, pH y firmeza determinados en este estudio están dentro del rango de valores habituales observado en variedades

de zanahorias comerciales (Barry-Ryan y O'beirne, 1998; Hernández-Santos *et al.*, 2016; Nguyen *et al.*, 2007; Richmond *et al.*, 2011).

La ausencia de diferencias entre las zanahorias sanas e infectadas fue corroborada por los estudios sensoriales de la apariencia y la calidad gustativa (Tabla 1), en los que participaron 76 y 77 consumidores, respectivamente. El análisis estadístico de los datos obtenidos en los test triangulares reveló en ambos casos *p*-valores superiores a 0,05, lo que indica que los consumidores no detectaron diferencias entre las muestras infectadas y las sanas, ni a nivel visual ni durante su degustación.

Como se ha mencionado en la introducción, no existen trabajos previos en los que se haya evaluado el efecto de CaLsol por sí misma sobre la calidad de las zanahorias, teniendo en cuenta que tampoco se ha establecido la relación directa entre la infección por CaLsol con la sintomatología al no poder reproducir los postulados de Koch. Un estudio llevado a cabo por Seljåsen *et al.* (2013) en el norte de Europa reveló que el ataque del psílido *T. apicalis*, principal vector de esta bacteria, afecta negativamente a la textura y el sabor de las zanahorias. Debido a la estrecha relación entre el ataque del psílido y la presencia de la bacteria en determinados países (Munyaneza *et al.*, 2011 y 2014), este estudio suscitaba dudas de hasta qué punto la bacteria podía estar implicada en la pérdida de calidad de las zanahorias. En este sentido nuestros resultados son esclarecedores, ya que en nuestra investigación se detectó la bacteria directamente mediante PCR en tiempo real, y, por otro lado, sabemos que el vector presente en la zona estudiada no es capaz de producir tantos daños en la planta como *T. apicalis*. Por tanto, en las condiciones de nuestros ensayos podemos afirmar que la bacteria por sí misma no tuvo un efecto sobre la calidad organoléptica de la zanahoria.

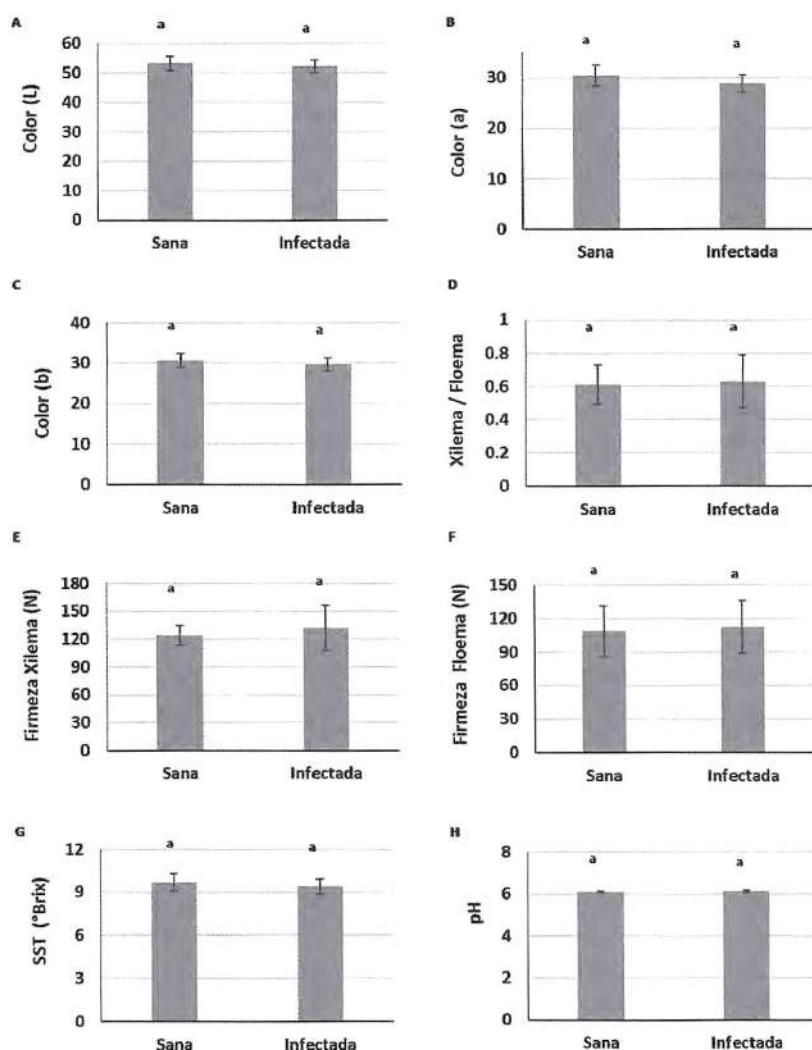


Figura 8. Parámetros fisicoquímicos determinados en zanahorias "sanas" (en las que no se detectó CaLsol) y zanahorias "infectadas" (en las que se detectó CaLsol). Se representan valores medios, y las barras verticales indican las desviaciones estándar. Para cada parámetro, letras idénticas indican que no hay diferencias significativas (prueba T-Student, nivel de confianza del 95% [$\alpha = 0,05$]).

Tabla 1. Resultados de ensayos triangulares realizados para comparar el aspecto y la calidad gustativa de zanahorias "sanas" (en las que no se detectó CaLsol) y zanahorias "infectadas" (en las que se detectó CaLsol). Un *p*-valor mayor que 0,05 indica que no hay diferencias significativas.

	Nº participantes	Nº aciertos	<i>p</i> -valor
Apariencia	76	28	0,296
Calidad gustativa	77	21	0,896

CONCLUSIONES

Los resultados de detección de CaLsol en zanahoria muestran que sigue sin poder establecerse una asociación directa entre la presencia de la bacteria en la planta y los síntomas que a veces se observan en la misma, ya que a pesar de haber un grado de infección por encima del 70 %, y una distribución de CaLsol por todo el vegetal, apenas hubo sintomatología. Además, la infección por CaLsol no afectó a la calidad físicoquímica ni a la calidad sensorial de las zanahorias. Todo ello explica que, a pesar del alto porcentaje de plantas infectadas en los últimos años en la zona de Villena, la comercialización del producto no se vea afectada.

BIBLIOGRAFÍA

- Alfaro-Fernández A., Siverio F., Cebrián M. C., Villaescusa F. J. & Font M. I.** 2012. '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' associated with *Bactericera trigonica*-affected carrots in the Canary Islands. *Plant Disease*, 96(4), 581–581. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-11-0878-PDN>
- Antolínez C.A., Moreno A., Ontiveros I., Pla S., Plaza M., Sanjuan S., Palomo J.L., Sjölund M.J., Sumner-Kalkun J.C., Arnsdorf Y.M., Jeffries C.J., Ouvrard D. & Fereres A.** 2019. Seasonal abundance of psyllid species on carrots and potato crops in Spain. *Insects*, 10(9), 287. <https://doi.org/10.3390/insects10090287>
- Barry-Ryan C. & O'beirne D.** 1998. Quality and shelf-life of fresh cut carrot slices as affected by slicing method. *Journal of Food Science*, 63(5), 851–856. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1998.tb17913.x>
- Bertolini E., Teresani G.R., Loiseau M., Tanaka F.A.O., Barbé S., Martínez C., Gentit P., López M.M. & Cambra M.** 2015. Transmission of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' in carrot seeds. *Plant Pathology*, 64(2), 276–285. <https://doi.org/10.1111/ppa.12245>
- Crosslin J.M., Munyaneza J.E., Brown J.K. & Lia W.L.** 2010. A history in the making: potato zebra chip disease associated with a new psyllid-borne bacterium – a tale of striped potatoes. *Potato zebra chip disease associated with a new psyllid-borne bacterium*. <https://doi.org/10.1094/APSnetFeature-2010-0110>
- EPPO.** 2020. PM 7/143 (1) '*Candidatus Liberibacter solanacearum*'. EPPO Bulletin, 50(1), 49–68. <https://doi.org/10.1111/epp.12611>
- Haapalainen M., Wang J., Latvala S., Lehtonen M.T., Pirhonen M. & Nissinen A.I.** 2018. Genetic variation of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' haplotype C and identification of a novel haplotype from *Trioza urticae* and stinging nettle. *Phytopathology*, 108(8), 925–934. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-17-0410-R>
- Haapalainen M., Latvala S., Wickström A., Wang J., Pirhonen M. & Nissinen A.I.** 2020. A novel haplotype of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' found in apiaceae and polygonaceae family plants. *European Journal of Plant Pathology*, 156(2), 413–423. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01890-0>
- Hajri A., Loiseau M., Cousseau-Suhard P., Renaudin I. & Gentit P.** 2017. Genetic characterization of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' haplotypes associated with apiaceous crops in France. *Plant Disease*, 101(8), 1383–1390. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-16-1686-RE>
- Hernández-Santos B., Martínez-Sánchez C.E., Torruco-Uco J.G., Rodríguez-Miranda J., Ruiz-López I.I., Vajando-Anaya E.S., Carmona-García R. & Herman-Lara E.** 2016. Evaluation of physical and chemical properties of carrots dried by refractance window drying. *Drying Technology*, 34(12), 1414–1422. <https://doi.org/10.1080/07373937.2015.1118705>
- Li W., Abad J.A., French-Monar R.D., Rascoe J., Wen A., Gudmestad N. C., Secor G.A., Lee I.-M., Duan Y., & Levy L.** 2009. Multiplex real-time PCR for detection, identification and quantification of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' in potato plants with zebra chip. *Journal of Microbiological Methods*, 78(1), 59–65. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.04.009>
- López Camelo A.F.** 2011. Gestión de la calidad en zanahoria (1a). Ediciones INTA. <https://inta.gob.ar/documentos/gestion-de-la-calidad-en-zanahoria>
- Markkula M., Laurema S. & Tiittanen K.** 1976. Systemic damage caused by *Trioza Apicalis* on carrot. En T. Jermy (Ed.), *The host-plant in relation to insect behaviour and reproduction* (pp. 153–155). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-4274-8_24
- Mendoza-Herrera A., Levy J., Harrison K., Yao J., Ibanez F., Tamborindeguy C.** 2018. Infection by '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' haplotypes A and B in *Solanum lycopersicum* 'MoneyMaker'. *Plant Disease*, 102(10), 2009–2015. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-17-1982-RE>
- Morales J., Tárrega A., Salvador A., Navarro P. & Besada C.** 2020. Impact of ethylene degreening treatment on sensory properties and consumer response to citrus fruits. *Food Research International*, 127, 108641.
- Munyaneza J. E., Fisher T. W., Sengoda V. G., Garczynski S.F., Nissinen A. & Lemmetty A.** 2010. First report of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' associated with psyllid-affected carrots in Europe. *Plant Disease*, 94(5), 639–639. <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-5-0639A>
- Munyaneza J.E., Sengoda V.G., Sundheim L. & Meadow R.** 2011. First report of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' associated with psyllid-affected carrots in Norway. *Plant Disease*, 96(3), 454–454. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-11-0870>
- Munyaneza J. E., Sengoda V. G., Sundheim L. & Meadow R.** 2014. Survey of '*Candidatus liberibacter solanacearum*' in carrot crops affected by the psyllid *Trioza apicalis* (Hemiptera: Triozidae) in Norway. *Journal of Plant Pathology*, 96(2), 397–402. <https://doi.org/10.4454/JPP.V96I2.019>
- Nehlin G., Valterová I. & Borg-Karlson A.-K.** 1994. Use of conifer volatiles to reduce injury caused by carrot psyllid, *Trioza apicalis*, Förster (Homoptera, Psylloidea). *Journal of Chemical Ecology*, 20(3), 771–783. <https://doi.org/10.1007/BF02059612>
- Nguyen L.T., Rastogi N.K. & Balasubramaniam V.M.** 2007. Evaluation of the instrumental quality of pressure-assisted thermally processed carrots. *Journal of Food Science*, 72(5), E264–E270. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00365.x>
- Nissinen A.I., Lemmetty A., Pihlava J.-M., Jauhiainen L., Munyaneza J.E., & Vanhala P.** 2012. Effects of carrot psyllid (*Trioza apicalis*) feeding on carrot yield and content of sugars and phenolic compounds. *Annals of Applied Biology*, 161(1), 68–80. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2012.00551.x>

- Teresani G.R., Bertolini E., Alfaro-Fernández A., Martínez C., Tanaka F.A.O., Kitajima E.W., Roselló M., Sanjuán S., Ferrándiz J.C., López M.M., Cambra M. & Font M.I. 2014. Association of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' with a vegetative disorder of celery in Spain and development of a real-time PCR method for its detection. phytopathology, 104(8), 804-811. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-13-0182-R>
- Teresani G.R., Hernández E., Bertolini E., Siverio F., Lozano A.M., Castiel A.F. & Alvarez M.C. 2017. Transmission of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' by *Bactericera trigonica* Hodgkinson to vegetable hosts. Spanish Journal of Agricultural Research, 15(4), 24.
- Verheijssen J., Smith G.R. & Weintraub P.G. 2018. *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae) and *Candidatus Liberibacter solanacearum* in potatoes in New Zealand: biology, transmission, and implications for management. Journal of Integrated Pest Management, 9(1). <https://doi.org/10.1093/jipm/pmy007>
- Schifferstein H.N.J., Wehrle T., & Carbon C.-C. 2019. Consumer expectations for vegetables with typical and atypical colors: The case of carrots. Food Quality and Preference, 72, 98-108. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2018.10.002>
- Secor G.A., Rivera V.V., Abad J.A., Lee I.-M., Clover G.R.G., Liefing L.W., Li X. & De Boer S.H. 2009. Association of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' with zebra chip disease of potato established by graft and psyllid transmission, electron microscopy, and PCR. Plant Disease, 93(6), 574-583. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-6-0574>
- Sejlsen R., Vogt G., Olsen E., Lea P., Høgetveit L.A., Tajet T., Meadow R. & Bengtsson G.B. 2013. Influence of field attack by carrot psyllid (*Triozia apicalis* Förster) on sensory quality, antioxidant capacity and content of terpenes, falcariindiol and 6-methoxymellein of carrots (*Daucus carota* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61(11), 2831-2838. <https://doi.org/10.1021/jf303979y>
- Richmond F., Méndez C.H. & Umaña G. 2011. Cambio en las características de calidad de 12 híbridos comerciales de zanahoria durante el almacenamiento. Agronomía Costarricense. <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/agrocot/article/view/6692>
- Plotto A., Baldwin E., McCollum G., Manthey J., Narciso J. & Irey M. 2010. Effect of *Liberibacter* infection (Huanglongbing or "Greening" Disease) of citrus on orange juice flavor quality by sensory evaluation. Journal of Food Science, 75(4), S220-S230. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01580.x>
- Rathore S., Dea S., Plotto A., Bai J., Manthey J., Narciso J., Irey M. & Baldwin E. 2015. Effect of blending orange juice with juice from healthy orange on flavor quality. LWT - Food Science and Technology, 62(1), Part 2, 868-874. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.06.020>
- Richmond F., Méndez C.H. & Umaña G. 2011. Cambio en las características de calidad de 12 híbridos comerciales de zanahoria durante el almacenamiento. Agronomía Costarricense. <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/agrocot/article/view/6692>

Graciano de Syngenta, la alternativa perfecta en melón piel de sapo para trasplantes tempranos de Almería

Graciano es la nueva variedad que Syngenta ha lanzado esta campaña para melón piel de sapo de trasplantes tempranos en Almería y que ya han probado varios productores importantes en esta zona. A mediados del mes de mayo ya podemos analizar la evolución de esta variedad en campo y, para ello, hemos hablado con José Miguel Sánchez, un productor de Melón en Almería que lleva 10 años plantando diversas variedades de melón Piel de Sapo en siembras muy tempranas, de primeros de febrero, y que este año ha probado Graciano en parte de su invernadero.

José Miguel realizó la siembra de Graciano el pasado 5 febrero y lo primero que destaca es que es una variedad más precoz que las otras variedades que utiliza: "A la hora de meter la colmena, Graciano va siempre por delante de los otros, con un tamaño muy similar pero con un escrutado muy bueno que no sale al final del ciclo, sino que ya se va formando desde el principio. Hemos comprobado que la variedad va siempre dos " Brix por delante de las otras y es casi una semana más precoz, por lo que lo cortamos antes y llegamos primero al mercado".

Esto es muy importante, ya que los precios que se pagan en piel de sapo temprano son mucho más altos las primeras semanas de venta: "Lo que más nos interesa es llegar primeros al mercado, ya que esto supone entre 30 y 40 céntimos más por

kilo y es fundamental para tener una buena rentabilidad. Con Graciano claramente hemos llegado primeros esta campaña y eso nos da mucha confianza en la variedad".

En cuanto a calibre, graciano está dando siempre frutos de más de dos kilos y hasta tres kilos, que es lo que pide el mercado: "La verdad es que los compradores piden este tipo de melón piel de sapo en variedades tempranas, con calibre de más de dos kilos y un buen escrutado. Graciano vemos que da frutos con buen calibre y rellenos, que no tienen tripa, y con un rayado muy fino que se vende muy bien. Si a ello le añades los buenos grados brix que da, pues es una variedad con un potencial comercial muy bueno".

Por último, y quizás lo más importante, le preguntamos a este productor si volvería a repetir con Graciano la próxima campaña: "Sin lugar a dudas repetiré con Graciano no solo por las ventajas que hemos visto que tiene a la hora de llegar al mercado sino, lo que es más importante, es por su buen manejo y por que no se raja en el ciclo productivo. Prácticamente no hay ningún fruto rajado en un manejo normal y eso es tan importante como que la variedad sea buena a nivel comercial. Un melón magnífico si se te raja en el invernadero no sirve para nada. Con Graciano esto no pasa y podemos trabajar seguros de llegar a fin de ciclo con un buen producto".